

題 名

Identification of a new membrane-associated protein which influences transport/maturation of gingipains and adhesins of *Porphyromonas gingivalis*

氏名 佐藤 啓子

緒言

歯周病の主な病原細菌に *Porphyromonas gingivalis* が知られている。本菌は嫌気性グラム陰性菌であり、様々な歯周病原因子を持つが、その中でも菌体表面あるいは菌体外に分泌される強力なプロテアーゼ (Kgp と Rgp) は本菌の線毛など、他の病原因子の成熟化にも関わっており、重要な病原因子である。

Kgp および Rgp は各々リジン残基およびアルギニン残基の C 末端側を切断するプロテアーゼであり、Kgp は 1 つの遺伝子 (*kgp*)、Rgp は 2 つの遺伝子 (*rgpA* と *rgpB*) にコードされている。翻訳直後の RgpA と Kgp はシグナルペプチド領域、プロ配列領域、プロテアーゼドメイン、凝集素ドメインの 4 つのドメインからなり、凝集素ドメインはさらに 4 つのサブドメインから構成される。一方、RgpB は RgpA の凝集素ドメインの大部分を欠いている以外は RgpA と極めて高い相同性を持つ。

これらのプロテアーゼについては、酵素学的解析は進んでいるものの、菌体表面への輸送や活性化については未解明であり、本研究はこの輸送活性化機構を明らかにする目的で行なわれた。

実験と結果

P. gingivalis の特徴の 1 つである血液寒天培地上での黒色コロニー形成能はプロテアーゼ変異株において顕著に低下していることから、黒色素形成に Kgp および Rgp が関与しているとされている。今回、transposon mutagenesis を用いて血液寒天培地上で黒色化しない変異株を分離した。この変異株は新規の遺伝子 (*porT*) 内に transposon 挿入変異があった。*porT* 変異株は brain heart infusion 培地での増殖速度においては野生株と変わらないが、Kgp および Rgp のプロテアーゼ活性は菌体、培養上清ともほとんど検出されず、Kgp Rgp 完全欠損株と同様な性状 (赤血球凝集反応の著しい低下や線毛タンパクの前駆体の蓄積) を示した。

P. gingivalis を含むグラム陰性細菌は、その表層に内膜 (細胞膜) と外膜という 2 つの膜構造を持ち、2 つの膜の間にペリプラズムとよばれる領域をもつ。そのため菌体内で合成された分泌タンパクは内膜通過のためのシグナルペプチド領域を持つ前駆体として合成され、内膜を通過する際にシグナルペプチド領域の切断除去をうけ、ペリプラズム空間に到達した後、様々な機構により外膜を通過し成熟タンパクとなる。*P. gingivalis* の Kgp と RgpA も細胞質内で約 190 kDa のシグナルペプチド領域をもつ前駆体として翻訳され、内膜と外膜を通過する段階で何らか

のプロセスを受け菌体表層付近で成熟型ドメインタンパクにプロセスされる。その後、大部分が膜結合型として存在するが、一部が菌体外へ分泌されることが報告されている。

ノーザンブロット解析より *porT* 変異株に *kgp*, *rgpA* および *rgpB* の転写産物がみられた。菌体を細胞質、内膜および外膜画分に分画し、Kgp および Hgp44 (凝集素ドメインの1つ) に対する抗体を用いたイムノブロット解析により、それらの局在を調べた。また、スフェロプラスト(外膜だけを部分的に破壊した状態の菌体)とペリプラズムに分画し、同様の解析を行なった。その結果、*porT* 変異株では成熟型のKgp (51 kDa) や Hgp44 (44 kDa) は検出されず、ペリプラズム画分に高分子量 (180~190 kDa) のKgp前駆体が蓄積していることが示唆された。この蓄積している高分子量Kgpは質量分析法により解析したところ、プロ配列領域からC末端の凝集素ドメインを含む前駆体であった。また、質量分析法から、RgpA および RgpB も同様に前駆体の状態で蓄積されていることがわかったが、Kgp, RgpA および RgpB のいずれの前駆体においてもシグナルペプチド領域は検出されなかった。

一方、イムノブロット解析から PorT タンパクは内膜画分に存在していることが示唆された。

考察

グラム陰性菌ではペリプラズムと外膜に存在するタンパクのほとんどがそのN末端にシグナルペプチド領域をもった前駆体として細胞質内で合成され、Sec膜透過装置により内膜の外側に輸送される。Kgp および Rgp も典型的なシグナルペプチド領域をもつことから、おそらく、この装置により内膜を通過するものと思われるが、その後の機構については全くわかっていない。PorTはシグナルペプチド領域を有しており、内膜画分に存在をみとめたが、構造上、膜貫通領域をもっていないことや、プロテアーゼK処理実験の結果と合わせると内膜に一部分結合した状態で存在していると考えられる。

porT 変異株ではKgp, RgpA および RgpB はシグナルペプチド領域を欠く前駆体としてペリプラズムに蓄積することから、PorT は内膜通過後のこれらの前駆体の外膜への輸送や成熟化プロセスに関与していることが示唆された。